



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias
Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio

TRABAJO FINAL INTEGRADOR

**Estudio seroepidemiológico de leptospirosis canina en
el Partido de Lomas de Zamora-**

ALUMNO: Med. Vet. Silvina Ruth Moldes

DIRECTOR: Dr. Eduardo Mortola

CODIRECTOR: Med. Vet Lorena Martin

INTRODUCCION

Los estudios seroepidemiológicos permiten estudiar la distribución de las enfermedades de manera indirecta, mediante la detección sérica de marcadores de infección y de inmunidad. Estos estudios son aplicables en investigaciones en salud pública, destinadas a determinar la prevalencia o incidencia de ciertas enfermedades y así evaluar programas de control sanitario, inmunización, etc. Para una buena calidad de los estudios seroepidemiológicos es importante que la muestra de sueros sea representativa de la población total que queramos estudiar. Asimismo, las pruebas serológicas a emplear deben tener una elevada sensibilidad, es decir que detecte los animales verdaderamente positivos que han tenido contacto con el microorganismo infeccioso; y una alta especificidad, es decir que detecte los animales verdaderamente negativos y que la positividad no sea debida a reacciones cruzadas con otros antígenos.

Cuando un animal toma contacto con un agente infeccioso y no es frenado por los mecanismos de la inmunidad innata, al tercer o cuarto día postinfección se empieza a producir una respuesta de anticuerpos, primero del isotipo IgM de corta duración, y más tarde del isotipo IgG que en muchos casos pueden ser detectados en suero durante toda la vida del individuo. La detección de estos anticuerpos producidos específicamente como respuesta a la presencia de antígenos del microorganismo causante de la infección, se puede realizar mediante técnicas inmunoserológicas y constituye la base de los estudios seroepidemiológicos.

Es importante destacar que en las enfermedades infecciosas en las que las formas subclínicas (infecciones inaparentes) son frecuentes, la seroepidemiología sólo nos proporciona datos sobre la infección y no sobre la enfermedad. Por otro lado, los estudios de seroprevalencia nos permiten conocer la circulación pasada o actual de un determinado microorganismo en una población, asimismo, nos permiten determinar las poblaciones de riesgo para la enfermedad, evaluar los mecanismos de transmisión, determinar los grupos de población críticos para mantener la transmisión del agente infeccioso, adecuar las medidas de control de la enfermedad y proponer soluciones.

La leptospirosis es una enfermedad infectocontagiosa y antropozoonótica de distribución mundial provocada por bacterias del género *Leptospira*. Las cepas patógenas afectan indistintamente al hombre, a animales domésticos y silvestres (Levett, 2004). Como en toda enfermedad infecciosa existe una tríada epidemiológica que determina su presentación en determinada región y momento. La *Leptospira spp.* como agente etiológico ha logrado adaptarse a distintas especies animales entre ellos el perro. Éste último, al estar en estrecho contacto con el hombre, es un factor

importante de riesgo epidemiológico al momento de desarrollarse dicha enfermedad (Martin et al 2015). El ambiente proporciona las condiciones propicias para que la *Leptospira spp.* sobreviva fuera del hospedador y de esa manera pueda entrar en contacto con ellos. Los animales, pueden dividirse en reservorios y hospedadores accidentales. Los reservorios mantienen la enfermedad en la naturaleza debido a que portan *Leptospira spp.*, principalmente en los túbulos contorneados del riñón. Los caninos se consideran reservorios del serovar Canicola sin embargo, pueden ser infectados por varios serovares como, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Castellonis, Pomona, Grippotyphosa, Bataviae, Bratislava, Autumnalis y Cynopteri (Fontaine, 2006; Sykes et al 2011). Por lo tanto, la aparición de la infección y/o enfermedad estará condicionada no sólo por la presencia de animales que eliminan *Leptospira spp.*, sino también, por las condiciones culturales y climáticas de cada región que contribuyen al mantenimiento de la *Leptospira spp.* en el ambiente y favorecen su contacto con los hospedadores.

Con respecto a la infección en caninos, estudios serológicos realizados en distintos ambientes urbanos del continente americano han hallado seroprevalencias de 18% a 63%. En Argentina se estima una prevalencia similar a la del continente de 10 a 60% aunque hay pocos datos sobre los valores a nivel nacional. Hasta la década de los noventa los serovares predominantes en caninos eran Icterohaemorrhagiae y Canicola. Sin embargo estudios posteriores a esta fecha han demostrado la incidencia de otros serovares como Castellonis, Pyrogenes, Cynoptery, Pomona y Grippotyphosa. En 1997, Rubel et al. reportaron una prevalencia para una población canina del Gran Buenos Aires de 57% siendo los serovares mas predominantes Pyrogenes, Canicola e Icterohaemorrhagiae. En el año 2005 Arias et al. encontraron una prevalencia de 25% en la zona de La Plata, Berisso y Ensenada siendo los serovares más comunes Pyrogenes (60%), Icterohaemorrhagiae (40%) y Canicola (35%). En el 2007 Tealdo et al. evaluaron muestras remitidas al Instituto de Zoonosis Luis Pasteur de la ciudad de Buenos Aires encontrando una prevalencia del 33%. Registraron el mayor índice de reactividad serológica entre los serovares Cynopteri (59%), Castellonis (19%), Canicola (16%) y Pyrogenes (16%).

Agente etiológico

La *Leptospira spp.* es un microorganismo delgado y flexible que tiene forma helicoidal, mide de 5 a 20 µm de longitud y 0,1 µm de diámetro. Al microscopio electrónico se observa que están constituidas por un cilindro citoplasmático enrollado, revestido por una membrana y dos filamentos axiales independientes que se insertan

en forma subterminal en los extremos opuestos del cilindro protoplasmático que no llegan a tocarse en su parte central (Adler and de la Peña Monteczuma, 2010).

Estos microorganismos son catalasa y oxidasa positivo. Su principal fuente de carbono y energía la constituyen los ácidos grasos insaturados de cadena larga. El nitrógeno, también requerido, lo obtienen de las sales de amonio. Tienen la particularidad de no utilizar en forma importante aminoácidos ni hidratos de carbono (Stanchi et al 2007).

La manera más efectiva de visualizarlos es mediante la microscopía óptica de campo oscuro, pudiendo también emplearse técnicas de precipitación de sales metálicas o tinciones especiales fundamentalmente en cortes de tejidos. Alternativamente pueden observarse claramente con microscopía de fluorescencia. El pH óptimo de crecimiento se ubica entre 7,2 a 7,4. Son muy sensibles a los medios ácidos, por este motivo se inactivan rápidamente en la orina ácida y dado que este fluido se puede utilizar para su aislamiento se debe tener la precaución de neutralizarla. Pueden sobrevivir largos periodos de tiempo en agua dulce, hasta 6 meses, mientras que en agua salada mueren rápidamente. Tienen una sobrevivencia alta en los suelos húmedos ligeramente alcalinos, no siendo así en los secos. Son sensibles al calor y frío extremos, como así también a los antisépticos y desinfectantes utilizados comúnmente (Faine, 1982; Stanchi et al 2007).

Si bien el género *Leptospira* se dividía en dos especies, *L. interrogans* patógena y *L. biflexa* saprófita/no patógena, en la actualidad, teniendo en cuenta características genéticas y utilizando técnicas de hibridación ADN-ADN, se reconocen 20 especies de *Leptospira* agrupadas en tres clados de acuerdo a su filogenia y patogenicidad. Un clado de especies saprófitas (cepas no patógenas del medio ambiente) comprendido por 6 especies. Un segundo clado de 9 especies patógenas (cepas aisladas de animales y humanos) y finalmente 5 especies llamadas intermedias debido a que difieren de las patógenas y saprófitas en la secuencia del ARNr 16s y para las cuales la virulencia no ha sido demostrada experimentalmente (Picardeau 2013).

La unidad fenotípica de la clasificación serológica es la serovariedad o serovar, la cual toma como base la especificidad de los antígenos O superficiales (lipopolisacáridos de membrana externa) de la bacteria. Los serovares se pueden agrupar en serogrupos de acuerdo a su reactividad antigénica cruzada (los mismos no tienen una base taxonómica, sin embargo han sido útiles para estudios epidemiológicos). Hasta el momento se han descrito más de 250 serovares para *L. interrogans* agrupados en 23 serogrupos y unos 60 serovares para *L. biflexa*.

Referent strains for the 20 species described in the genus <i>Leptospira</i> . <i>Souches de référence des 20 espèces aujourd'hui décrites dans le genre <i>Leptospira</i>.</i>			
Species	Serogroup	Serovar	Strain
Pathogenic			
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Fiocruz LI-130
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M84
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	Atlantae	LT81
<i>L. alexanderi</i>	Manhao	Manhao 3	L 60
<i>L. alstonii</i>	ND	Sichuan	79,601
<i>L. kmetzi</i>	ND	ND	Bejo-Iso 9
Intermediate			
<i>L. wolffii</i>	ND	ND	Korat-H2
<i>L. licerasiae</i>	ND	Varillal	VAR010
<i>L. inadai</i>	Tarassovi	Kaup	LT64-68
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge	BUT6
<i>L. broomii</i>	Undesignated	ND	5399
Saprophytes			
<i>L. wolbachii</i>	Codice	Codice	CDC
<i>L. meyeri</i>	Semaranga	Semaranga	Veldrat
<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc	Patoc 1
<i>L. vanthielii</i>	Holland	Holland	WaZ Holland
<i>L. terpestrae</i>	ND	ND	LT 11-33
<i>L. yanagawae</i>	Semaranga	Saopaulo	Sao Paulo

Picardeau M, 2013

Patogenia y signos clínicos

La fisiopatología de la leptospirosis no está totalmente dilucidada en la actualidad, no obstante puede ser consecuencia de la interacción de eventos como la presencia física del microorganismo por acción directa, la liberación de exo o endotoxinas ya sea por exocitosis o lisis del mismo, que actúen sobre las distintas células blanco, junto con fenómenos de tipo inflamatorio, los cuales serían los responsables de los disturbios funcionales y/o muerte de las células afectadas (Linzitto et al 2013).

La *Leptospira* spp. ingresa al huésped a través de pequeñas heridas o abrasiones cutáneas o a través de las membranas mucosas intactas de la cavidad oral, nasal o conjuntival (Greene, 2008). Luego de ingresar invade el torrente circulatorio produciendo una bacteriemia. Existe una rápida división y posterior invasión de distintos órganos tales como riñón, bazo, sistema nervioso central, globos oculares y tracto genital donde se vuelven a replicar. Una de las sustancias que sintetiza es la hialuronidasa que junto con la movilidad de la bacteria, le permite atravesar rápidamente distintos tejidos por despolimerización de la sustancia intercelular. No se conoce aún la causa por la cual algunos serovares tienen una especial predilección por las células de determinados parénquimas (riñón, pulmón, hígado). Las células endoteliales de los precapilares y capilares, son también unas de las más afectadas (Greene, 2008).

Esta etapa aguda, se conoce como fase de leptospiemia o septicémica y dura alrededor de una semana. La lesión celular se produciría en dos etapas: a) **interacción**, en la cual existiría una unión específica de la bacteria con la membrana plasmática de la célula *target* y b) **posterior penetración y agresión celular**, produciendo alteraciones funcionales de distinta magnitud, que llevarían en algunos casos a la muerte de la célula. Las toxinas, pueden ser liberadas por el microorganismo vivo o durante su lisis. Podría tener una marcada importancia en la génesis de los eventos disfuncionales, la estimulación por parte de la *Leptospira spp.*, en cuanto a la liberación de citoquinas, compuestos vasoactivos y de acción citotrófica, que forman parte de los mediadores de fase aguda para algunos tipos de respuesta inflamatoria (Stanchi et al 2007).

Los acontecimientos resultantes de la acción deletérea de *Leptospira spp.* sobre el organismo serían por un lado, una reacción inflamatoria intersticial, que precede a una extensa vasculitis sistémica que produciría disfunción, lesión y muerte de la célula endotelial con procesos de extravasación. Debe tenerse en cuenta que la primera estructura afectada es la capilar. Por otro lado y como resultado de lo anterior, los parénquimas y tejidos, se verían afectados en su normal aporte e intercambio, primero con un cuadro de hipoxia y luego por la instauración de anoxia y necrosis regional, manifestándose por distintos tipos de trastornos funcionales, según el órgano afectado, cuya magnitud va a depender de variables orgánicas del hospedador y del microorganismo, como son, serovariedad de *Leptospira spp.*, patogenicidad de cepa, dosis infectiva, calidad de la respuesta inmunológica del hospedador, órgano afectado, entre otras. Luego hay una segunda etapa conocida como fase inmune que comienza alrededor de la segunda semana. Esta se caracteriza por la aparición de anticuerpos específicos contra *Leptospira spp.*, la desaparición del microorganismo del torrente sanguíneo, localización en diferentes órganos y el comienzo de la eliminación de *Leptospira spp.* por la orina (Leptospiuria) (Stanchi et al 2007).

En el riñón por su parte, la lesión característica es una nefritis túbulointersticial, mientras que en los estados crónicos de la enfermedad la *Leptospira spp.* es capaz de inducir una fibrosis renal. Una de las causas más importantes, sería el daño tisular, debido a lesiones endoteliales de glomérulos y túbulos que producirían fenómenos hipóxicos. No se descarta la acción directa del microorganismo (efecto citotóxico), ya que es factible visualizarlo en el interior de las células tubulares, intersticio y glomérulos. En los casos de glomerulonefritis graves, se detecta la presencia de inmunocomplejos circulantes (IgG/IgM) y depósitos de componentes del Complemento (beta C1). Se concluye que por acción bacteriana directa o alteración en la

microcirculación, asociada a una reacción inflamatoria, se desencadenarían los eventos patogénicos (Yang et al. 2002; Fraga et al. 2010).

En el hígado puede ocurrir una grave disfunción sin cambios histopatológicos importantes. Se presume que el daño hepatocelular inicial y la persistencia de la bacteria produce una alteración de la circulación hepática, fibrosis y cambios inmunológicos que perpetúan la respuesta inflamatoria crónica. La hepatitis activa crónica ha sido una secuela de la enfermedad con algunas serovariedades (Greene, 2008).

La infección en los caninos puede tomar un curso subclínico o clínico. A su vez, la enfermedad clínica puede presentarse en forma sobreaguda, aguda, subaguda o crónica y la gravedad clínica se ve influenciada por factores tales como, edad del animal, estado de vacunación y virulencia del serovar infectante. Las manifestaciones clínicas son variadas y ninguna es patognomónica. Entre las más frecuentes se encuentran: anorexia, letargia, vómitos, diarrea, pérdida de peso, hiperestesia muscular, estomatitis, glositis, inyección de vasos episclerales y deshidratación. Los perros que presentan falla renal aguda además manifiestan poliurea, polidipsia o falla renal con oliguria o anuria. Los animales que desarrollan una falla hepática muestran signos de ictericia o signos generales de insuficiencia hepática (inapetencia crónica, pérdida de peso, ascitis, ictericia o encefalopatía hepática). La hematemesis, hematoquesia, hemoptisis, melena, epistaxis y hemorragias petequiales también pueden presentarse debido a la trombocitopenia y coagulación intravascular diseminada (Birnbaum et al. 1998; Goldstein et al. 2006; Geisen et al. 2007).

Otras manifestaciones menos frecuentes que pueden observarse son conjuntivitis, uveítis, taquipnea o disnea y tos (Townsend et al. 2006). Estas tres últimas presentaciones clínicas son debidas al síndrome de distress respiratorio agudo o síndrome de hemorragia pulmonar, entidad bien reconocida en leptospirosis humana y en algunos caninos en Europa (Kohn et al. 2010). Si bien el aborto no es un signo habitual en caninos, se ha reportado un caso debido al serovar Buenos Aires, serogrupo Djasiman que no había sido descripto antes en nuestro país (Rossetti et al. 2007).

Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad puede establecerse en forma presuntiva con los datos de los análisis clínicos interpretados en conjunto con la epidemiología y signología clínica; mientras que para el diagnóstico definitivo debe recurrirse a los

métodos directos e indirectos específicos para *Leptospira spp.* como aislamiento bacteriano y/o estudios inmunológicos.

Análisis clínicos

Las anormalidades hematológicas más comunes encontradas en perros con leptospirosis son: leucocitosis neutrofílica con desvío a la izquierda, aunque en caso de shock séptico puede presentarse leucopenia. También trombocitopenia, anemia regenerativa o no regenerativa. En los perros con falla renal las anormalidades bioquímicas séricas más comunes son urea y creatinina aumentadas. La disfunción hepática suele manifestarse con aumento de la actividad sérica de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (FAS), así como hiperbilirrubinemia e hipoglucemia. Los perros con alteraciones musculares pueden tener actividad creatinina cinasa (CK) aumentada. Las anormalidades en el análisis de orina incluyen glucosuria, proteinuria glomerular o tubular, bilirrubinuria y aumento de cilindros granulosos, leucocitos y eritrocitos en el sedimento (Nelson, 2005; Miller et al. 2007).

Metodos directos

Los métodos directos son aquellos que detectan la presencia del agente o su ácido nucleico en la muestra clínica (sangre, orina, órganos) y entre ellos se pueden mencionar el aislamiento, la inmunofluorescencia directa, la observación microscópica directa y las técnicas moleculares.

*El aislamiento del microorganismo puede ser realizado a partir de sangre y líquido cefalorraquídeo en la primer semana de la enfermedad o de orina en los casos que hayan transcurrido más de 7 días del comienzo de los signos. También puede ser efectuado a partir de órganos, humor acuoso o productos de abortos. Se debe tener en cuenta que las muestras deben ser extraídas antes que el animal reciba tratamiento y ser enviadas en forma inmediata al laboratorio. Desde el punto de vista de su desarrollo in vitro, la *Leptospira spp.* se cultiva en medios artificiales como los de Fletcher, EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) entre otros, siendo la base de éstos, suero de conejo, peptona, sales de sodio, amonio, potasio, calcio y magnesio, agar y caldos simples, ya sean semisólidos o líquidos. El tiempo de incubación es prolongado y en general se recomienda una incubación de 6 meses antes de dar como negativo un aislamiento (Faine, 1982; Stanchi et al. 2007).

*La Inmunofluorescencia directa resulta útil cuando el material no es apto para el cultivo bacteriológico pero requiere de un conjugado específico anti*Leptospira* y

como generalmente se realiza a partir de improntas de órganos ha sido poco aplicada en el diagnóstico canino (Brihuega, 2010).

*La Observación microscópica directa u Observación previa coloración. En el primer caso se usa microscopio de campo oscuro, es posible realizarla a partir de sangre, orina, leche y suspensiones de órganos. Es el único método para visualizar *Leptospira spp* vivas. Se pueden detectar en sangre durante la leptospiremia (primera semana – período febril) y en orina después de la primera semana durante la leptospiruria. Debido al escaso número y a su aparición intermitente en fluidos y materiales clínicos, sólo en el 10 % de los positivos es posible visualizarlas. Con respecto a la observación por coloración, las únicas tinciones que se pueden usar son Inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, o tinción con plata; pues se caracterizan por no tomar las coloraciones habituales de Giemsa. Los resultados que se obtienen son variables debido a que en general no existe gran cantidad de *Leptospira spp* en los fluidos orgánicos o materiales utilizados (Stanchi et al 2007).

*Las Técnicas Moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En las últimas décadas la aplicación de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha permitido mejorar el diagnóstico de leptospirosis. Hasta la fecha se han publicados numerosos protocolos de PCR punto final y en tiempo real para detección y/o cuantificación de *Leptospira spp.* en animales (Martin et al. 2015). Sin embargo, pocos han sido sometidos a un riguroso protocolo de validación para su aplicación confiable en el diagnóstico de leptospirosis humana (Brown et al 1995; Merien et al 1992) siendo aún más escasos los protocolos validados para veterinaria.

Particularmente en caninos, se describieron técnicas en tiempo real y punto final que utilizan cebadores dirigidos a un fragmento del gen *lipL32* presentes sólo en las especies patógenas del género (Rojas et al. 2010; Monte et al. 2012). Mientras que otros autores han utilizado fragmentos de genes como *secY* o *lig A-B* para la detección también de especies patógenas en muestras de caninos (Ahmed et al. 2012; Xu et al 2014)

Metodos indirectos

Los metodos indirectos son aquellos que detectan la presencia de anticuerpos formados en respuesta a la entrada del agente. Constituyen los métodos de laboratorio más utilizados en la clínica diaria (Brihuega, 2010).

En el inmunoanálisis, se ponen de manifiesto, las inmunoglobulinas que hacen su aparición entre el 5 y 10 días de comenzada la fase invasiva, siendo las mismas en primer lugar del tipo IgM y posteriormente, las IgG. Las primeras, pueden detectarse hasta 3 meses de comenzada la enfermedad, las segundas, son factibles de cuantificar hasta 2 años después, lo que nos permite hacer estudios horizontales retrospectivos con el fin de reconocer pacientes infectados asintomáticos o que padecieron sintomatología leve. Sin embargo esta permanencia por largos períodos suele confundir el diagnóstico del profesional inexperto, la seroreactividad indicaría sólo el contacto con *Leptospira spp* pero no significa que los signos clínicos sean atribuidos a una infección actual. Por este motivo es más adecuado hablar de seroreactividad (suero reactivo) en lugar de seropositividad (suero positivo). La respuesta mediada por anticuerpos es rápida e importante desde el punto de vista cuantitativo.

Dentro de las reacciones específicas de Género o de screening se incluye:

a) Prueba de Aglutinación Macroscópica en Placa con Antígeno Termo resistente (TR):

Es una determinación muy fácil de realizar, de bajo costo, que no requiere entrenamiento previo y confiable en medicina humana. Se utiliza una suspensión densa de *Leptospira spp*, tratadas con calor (TR “termo resistente”), a la cual se enfrenta suero del paciente y se observa la presencia de aglutinación. El antígeno TR es una fracción termorresistente común al género *Leptospira spp*. y que reacciona frente a cualquier serovar. Es un antígeno estable y se puede mantener hasta ocho meses. Esta reacción se caracteriza por presentar positividad hacia el cuarto día del inicio de la enfermedad, haciéndose negativa hacia el día 45. Este método es útil para realizar *screening*, sin embargo ante la presencia de un suero reactivo, debe confirmarse con la prueba de referencia (Picardeau et al. 2014).

b) Contrainmunoelectroforesis (CIE): Esta técnica permite el manejo de gran cantidad de muestras en forma simultánea y ofrece un diagnóstico bastante rápido 2 a 3 horas. Se utilizan soportes de agarosa, a los que se le hacen pocillos de 2 mm de diámetro en dos hileras enfrentadas en los cuales se colocan en una el suero problema y en la otra la suspensión de antígenos preparada, se introducen en una cuba electroforética y se realiza la corrida en dos etapas. Las reacciones positivas se caracterizan por dar bandas de precipitación las cuales pueden ser coloreadas (AAVLD, 1994).

c) Inmunofluorescencia Indirecta: Esta técnica requiere la utilización de anticuerpos conjugados a un colorante fluorescente. Se puede utilizar para detectar anticuerpos en fluidos o tejidos. La sensibilidad y especificidad se corresponden en general con los

parámetros de la prueba de ELISA. Sin embargo, esta técnica no se encuentra disponible comercialmente para el diagnóstico en caninos y requiere un microscopio preparado para captar emisión fluorescente originada al utilizarse luz ultravioleta como fuente de iluminación (Picardeau et al. 2014).

d) Pruebas de ELISA: Se han desarrollado varios métodos de ELISA para el diagnóstico de leptospirosis en caninos. El test de ELISA tiene como ventajas que puede detectar anticuerpos específicos antes que la técnica de MAT. Por otra parte, permite detección de inmunoglobulina M (IgM) e inmunoglobulina G (IgG), por lo tanto entrega información sobre la fase de la enfermedad. A pesar de sus ventajas como prueba tamiz carece de la capacidad de caracterizar serovares y todo resultado positivo con ELISA debe ser confirmado por MAT (Arias et al. 1999; Dey et al. 2004)

e) DIPSTICK: Consiste en una prueba de inmuno oro para el diagnóstico serológico de leptospirosis canina y humana. Los datos de sensibilidad y especificidad varían ampliamente en diferentes estudios realizados con muestras de suero humano. Levett et al 2001 demostraron un sensibilidad y especificidad para un ensayo IgMdipstick 98% y 90.6% respectivamente. Mientras que otros autores han descrito valores inferiores de 78.7% de sensibilidad y 88.3% de especificidad (Sehgal et al 1999).

Se debe recordar que todos estos métodos de diagnóstico, son específicos de género. Solamente nos informan la presencia de anticuerpos anti *Leptospira* spp, sin especificar a que serovariedad pertenecen.

Reacciones específicas de serovar

Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT): El método considerado de referencia tanto en caninos como en humanos es el Test de Microaglutinación (MAT, de su sigla en inglés Microscopic Agglutination Test) creado por Martín y Petit, actualmente es un método de referencia internacional (*gold standard*) para el diagnóstico de leptospirosis basado en la cinética de los anticuerpos aglutinantes enfrentados con antígenos vivos.

La prueba consiste en enfrentar el suero diluido de los caninos sospechosos con cada uno de los antígenos (cultivos vivos de *Leptospira* spp, de 7 a 10 días de repicados) representativos de todos los serogrupos de *Leptospira* spp. Con frecuencia en algunos laboratorios se enfrentan solo aquellos serovares más comunes para la especie a estudiar. Por ejemplo en nuestro país se debería incluir en el panel de antígenos para el diagnóstico en caninos como mínimo un representante de los 5 serogrupos descritos en esta especie (Ballum, Canicola, Icterohemorrhagiae, Pomona y Pyrogenes). La suspensión suero/antígeno es incubada a 37 °C durante

una hora y luego se realiza la lectura en microscopio de fondo oscuro en búsqueda de aglutinación. En los caninos se realiza una primera lectura con diluciones 1/100 para cada serovariedad y luego se determina el título de aquellas serovariedades reaccionantes en la primera etapa. Se considera como título final la última dilución en la cual se observó aglutinación de al menos el 50% de las *Leptospira spp* comparadas con un testigo. Estos microorganismos se aglutinan formando “clumps” semejando estrellas o soles refringentes, a veces como pequeños puntitos o comas. Si bien se puede realizar MAT en diferentes tipos de muestra: suero sanguíneo, lácteo, orina, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso; la muestra de elección es el suero sanguíneo

Es importante señalar que la serología positiva no indica infección presente, sino solo presencia de anticuerpos. Para determinar infección presente se debe realizar un muestreo pareado de sueros con un intervalo de por lo menos 15-21 días en el mismo laboratorio. El criterio para considerar un resultado indicativo de enfermedad o infección reciente es un aumento de 4 veces en el título de sueros pareados o bien, la conversión de seronegativo a un título de 1:100 o mayor. En los casos de títulos resultantes de vacunación previa, exposición o infección crónica no se observa este fenómeno de seroconversión (Stanchi et al 2007). Algunos autores consideran que un título alto en la primer muestra ($>1/800$; sin estar vacunado) en presencia de signos clínicos y con historia compatible de contacto con factores de riesgo confirma el diagnóstico (Greene, 2008).

Es común durante la infección aguda que se observen reacciones a más de un serovar. Estas aglutinaciones cruzadas son atribuibles a la presencia de anticuerpos IgM, los cuales pueden persistir por varios años. En algunos casos se interpreta como que los títulos más altos pertenecen al serovar infectante, mientras que los títulos más bajos se deben a reacciones cruzadas. Sin embargo puede haber títulos altos a un serovar no infectante. Estas reacciones conocidas como “reacciones paradójicas” son comunes sobretodo en infecciones tempranas (Greene, 2008).

Si bien la técnica de MAT es altamente específica y no presenta reacciones cruzadas con otras enfermedades su sensibilidad es limitada en la fase aguda de la enfermedad. Por lo tanto todo resultado negativo en la primera muestra debe evaluarse con el envío de la muestra pareada si la signología clínica sugiriera una fuerte sospecha de la enfermedad. Asimismo, debe tenerse en cuenta que una temprana administración de antibióticos, puede detener el desarrollo de los anticuerpos, los que pueden aparecer después de haber realizado la prueba serológica con resultado negativo, o pueden aumentar muy poco el título.

En Argentina, se utilizan comúnmente las pruebas de TR y el MAT, siendo esta última la de referencia. Las muestras de sangre para las distintas reacciones serológicas de diagnóstico, se debe realizar a partir de los 5 a 10 días del comienzo de los síntomas ya que antes difícilmente se obtengan resultados positivos. El suero debe ser separado rápidamente del coágulo y refrigerado hasta su utilización; puede ser congelado a - 20°C para conservarlo por largos periodos de tiempo, sin embargo la congelación/ descongelación repetida baja los títulos de anticuerpos.

Las extracciones siempre deben ser pareadas, con un intervalo de tiempo de 15 a 21 días entre la primera y segunda toma de muestra. Títulos elevados (por ejemplo mayor a 1/800) para uno o más serovares en la primera muestra son considerados positivos a leptospirosis. Un primer título de 1/100 se considera positivo si la muestra pareada presenta un incremento de 4 veces o más el título del primer estudio (Normativa de Notificación de Enfermedades de Denuncia Obligatoria en Veterinaria en pequeños animales, 2016).

Diagnóstico diferencial

Se suele confundir a esta enfermedad con muchas otras por la diversidad de la presentación del cuadro clínico. Entre las más importantes se pueden mencionar: moquillo canino, parvovirus-coronavirus, trombocitopenias, intoxicación warfarínica, nefritis e insuficiencia renal aguda de distintos orígenes, colangiohepatitis, peritonitis.

Tratamiento, pronóstico y prevención

El tratamiento con antibióticos, en general reduce la fiebre y las complicaciones a nivel de los órganos afectados, acortando el periodo de evolución. El antibiótico de elección es la doxiciclina, pudiéndose utilizar también, eritromicina; otros antibióticos como la penicilina, ampicilina o amoxicilina tienen algunas dudas sobre su efectividad por estudios realizados en doble ciego (Linzitto et al 2014). La estreptomycin y doxiciclina permiten la eliminación de *Leptospira spp* de los sitios donde se acantona. El pronóstico es reservado para pacientes con falla renal aguda y/o enfermedad hepática. Los perros usualmente se recuperan después de 2 semanas, si son tratados prontamente con antibióticos y fluidos endovenosos. Sin embargo, si el daño renal ó hepático es severo la infección puede ser fatal (Greene, 2008).

Los propietarios deben ser advertidos que la leptospirosis es una enfermedad zoonótica que se disemina principalmente por orina de perros infectados. La zona de habitación y áreas externas de un perro infectado necesitan ser tratadas con

desinfectantes apropiados (hipoclorito al 10 %). Además, los perros deben evitar, aguas estancadas lodosas y roedores. El control de roedores debe instituirse.

Las vacunas actualmente utilizadas en perros en la mayoría de los países contienen los serovares Canicola e Icterohaemorrhagiae (Minke et al. 2009). En vacunas más recientes Grippotyphosa y Pomona han sido agregadas (Klaasen et al. 2013).

IMPORTANCIA DEL TRABAJO

El estudio seroepidemiológico de leptospirosis canina en el Partido de Lomas de Zamora y la evaluación de las técnicas serodiagnostics empleadas, como trabajo final integrador de la Carrera de Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio, presenta una temática original para la zona geográfica elegida y de interés no sólo para la medicina veterinaria sino también para la salud pública por ser esta enfermedad una afección zoonótica.

OBJETIVOS

Objetivos generales

- Evaluar la prueba de TR como tamiz diagnóstico de leptospirosis canina.
- Determinar la frecuencia de leptospirosis canina en el Partido de Lomas de Zamora, Pcia. de Buenos Aires.

Objetivos específicos

- Realizar la técnica de MAT a partir de muestras provenientes de caninos con datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio compatibles con leptospirosis.
- Clasificar la población en estudio como casos confirmados y casos descartados teniendo en cuenta los criterios recomendados por el Manual de Notificación Obligatoria de enfermedades en pequeños animales.
- Evaluar la prueba de TR como tamiz diagnóstico en las muestras de caninos con diagnóstico confirmado y descartado de leptospirosis.
- Determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba de TR como tamiz diagnóstico.
- Determinar la frecuencia de perros seropositivos a *Leptospira* spp. en la población establecida y clasificar de acuerdo a la raza, sexo y edad.
- Analizar los factores ambientales y socioculturales que puedan estar asociados con la seropositividad.

- Conocer la situación epidemiológica de la enfermedad en la población canina del Partido de Lomas de Zamora, proporcionando información y herramientas técnicas para el control epidemiológico de la enfermedad.

HIPOTESIS

- La capacidad de la técnica de TR como prueba tamiz en caninos sospechosos de haber adquirido leptospirosis es discutida.
- En el Partido de Lomas de Zamora hay caninos positivos a *Leptospira* spp. ya que existen las condiciones climáticas, socioeconómicas y culturales que contribuyen al mantenimiento de *Leptospira* spp en el ambiente.

MATERIALES Y METODOS

Muestras

Se utilizaron 97 muestras de sangre provenientes de caninos con propietario, que ingresaron al Hospital Veterinario Banfield ubicado en la calle AV. Pte. Perón Nro. 3001, Localidad Banfield, Partido de Lomas de Zamora, zona sur del Gran Buenos Aires, durante el período establecido entre el 20 de diciembre del 2015 hasta el 30 de junio del 2016.

Se muestrearon todos los animales que llegaron al Hospital con signología compatible con leptospirosis (hipertermia, adinamia, anorexia, congestión de vasos episclerales, vómitos, etc). Para cada uno de ellos se confeccionó una ficha donde se detallaron los datos de edad, raza, sexo, lugar de residencia, signos clínicos, motivo de consulta, plan de vacunación. Conjuntamente con la toma de muestras, se realizaron encuestas epidemiológicas a los dueños de los caninos. El contenido de las preguntas estuvo destinado a obtener datos sobre los factores ambientales y socioculturales los cuales fueron evaluados conjuntamente con los resultados serológicos obtenidos.

Modelo de encuesta empleada

Paciente: Reseña: Especie: Raza: Sexo: Edad: Motivo de consulta:	Fecha: Protocolo:
--	--

Anamnesis:
Uso de la mascota: Guardia.. ☐ Caza ☐ Compañía ☐ Otra ☐
Hábitos: No sale ☐ Sale c/ el propietario c/ correa ☐ Sale c/ el propietario s/ correa ☐
Sale sin supervisión ☐ Vagabundo ☐
Contacto con basurales: Ninguno ☐ Esporádico ☐ Frecuente ☐
Comportamiento de caza: Sí ☐ No ☐ Caza de roedores: Sí ☐ No ☐
Presencia de aguas estancadas cercanas a la vivienda: No ☐ Transitoria ☐ Permanente ☐
Observación de roedores en el último año: No ☐ Esporádica ☐ Frecuente ☐
Vacunado contra leptospirosis: Sí ☐ Fecha: No ☐ Desconoce ☐
Desparasitado: Sí ☐ Con qué frecuencia No ☐ Desconoce ☐
Lugar de eliminación de excretas: En la calle ☐ En el domicilio ☐ Ambas ☐
Hábitos alimenticios: Alimento balanceado ☐ Comida casera ☐ Ambas ☐

Examen físico:								
Peso	Actitud	Mucosas	TLC	Hidratación	FC	Pulso	FR	T°

Presenta signos clínicos en el momento: Sí ☐ ¿Desde cuándo? No ☐

Piel / Linfonodos	
Digestivo	
Cardio / Respiratorio	
Urogenital	
Musculo-esquelético / Nervioso	

En nuestro estudio, la definición de casos se basó en los resultados obtenidos con la técnica de microaglutinación (MAT). Fueron considerados como casos confirmados de leptospirosis (animales positivos) aquellos que presentaron un título a MAT mayor o igual a 1/800, no vacunados contra leptospirosis y con signología clínica y parámetros de laboratorio compatibles con la enfermedad según lo establecido en la Normativa de Notificación de Enfermedades de Denuncia Obligatoria en Veterinaria en pequeños animales, 2016.

Estudio serológico

Para la detección de anticuerpos contra leptospirosis se utilizaron las muestras de suero de pacientes sospechosos a leptospirosis y se procesaron por las pruebas de:

TR: con el antígeno proporcionado por el Laboratorio del INER, Dr. Coni, Santa Fe, y realizado de acuerdo a las instrucciones del laboratorio productor. Brevemente, sobre un portaobjeto mezclar 8ul de suero problema y 8ul de antígeno TR. Homogeinizar sin agrandar demasiado la gota y rotar para

favorecer la reacción. Observar durante los 4 minutos la presencia o no de aglutinación.

MAT: para la realización de la prueba se emplearon 9 serovares de *Leptospira spp.* (Castellonis, Canicola, Copenhageni, Pomona, Pyrogenes, Grippotyphosa, Hardjo, Wolffi, Tarassovi) como antígenos vivos. Se partió de una dilución 1/100 (suero + antígeno) enfrentando cada suero con los distintos antígenos para verificar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira spp.* Se consideró reactivo un suero que aglutina el 50 % de *Leptospira spp.* en comparación con el control. Aquellos sueros que reaccionaron a la primera prueba fueron diluidos en progresión geométrica en base 2 hasta la última dilución que presentó la aglutinación mencionada y fue considerada como título final.

Esta prueba se realizó en el Laboratorio Central de la Facultad de Cs. Veterinarias de la UNLP.

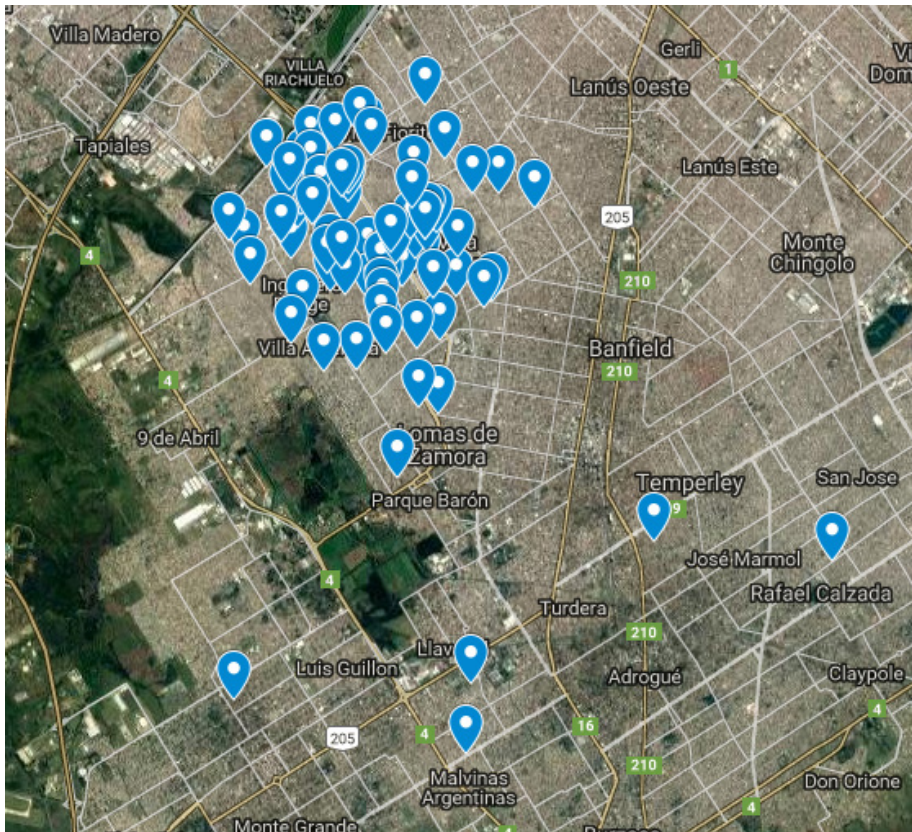
Análisis de resultados

Con la información obtenida se confeccionó una base de datos (utilizando el programa excel), a fin de establecer los parámetros estadísticos relacionados con el empleo de la técnica de TR como prueba tamiz y su comparación con los animales considerados como casos confirmados (animales positivos) y no casos. Los resultados fueron analizados mediante el software de dominio público WINEPI.net.

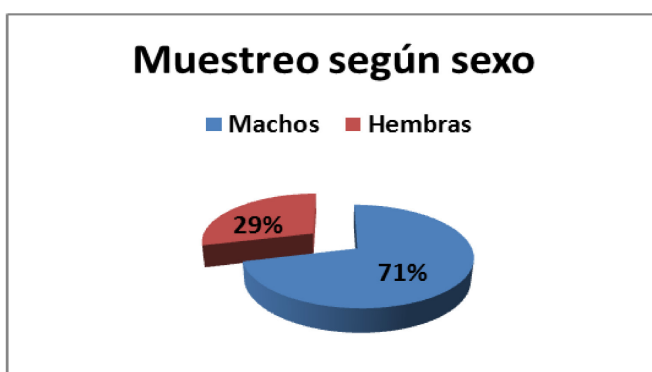
Se estableció la relación entre la frecuencia de animales positivos y los datos ambientales y socioculturales que arrojó la encuesta realizada.

RESULTADOS

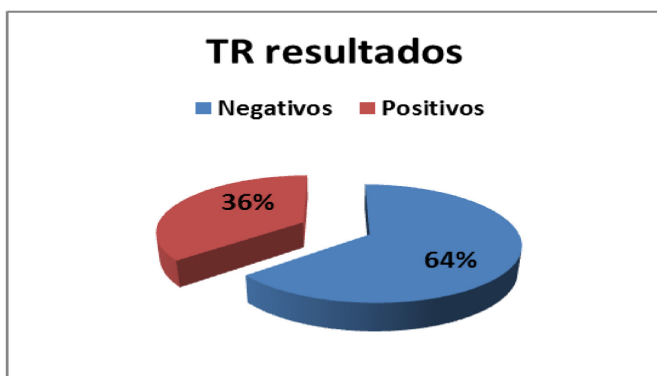
Las muestras analizadas derivaron de pacientes caninos que ingresaron al Hospital Veterinario Banfield, Lomas de Zamora (97 pacientes), con sospecha de leptospirosis. De todas las muestras incluidas en este estudio, se recabó la información requerida en la encuesta realizada. A continuación se observa un mapa de georeferenciación de las muestras del estudio como también fotoa de algunos de los vecindarios de donde procedieron las muestras.



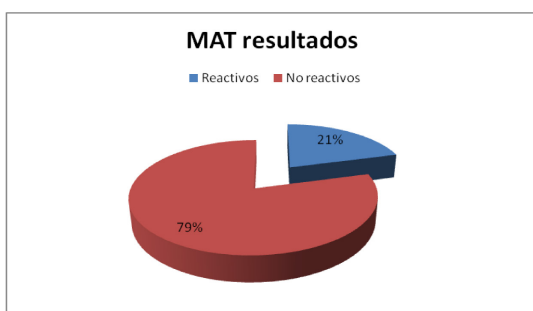
Del total de muestras analizadas el 71% fueron machos y el 29% hembras.



La técnica de TR empleada arrojó 36% de animales positivos (35 muestras) y 64% de animales negativos (62 muestras).



La técnica de MAT arrojó 21% de animales reactivos (21 muestras) sin embargo sólo el 4 % fueron casos confirmados de leptospirosis según los criterios establecidos en el Manual de eventos de Notificación Obligatoria, 2016.



Del panel de serovares evaluados, se encontró reactividad frente a los serovares Canicola, Castellonis y Copenhageni. La mayoría de las muestras (87%) fueron positivas sólo al serovar Canicola, y una sola muestra fue positiva al serovar Copenhageni. El 13% restante resultó positivo a 2 serovares (Canicola/Copenhageni y Canicola/Catellonis).

De los casos confirmados de leptospirosis, según el análisis de los datos de la encuestas, fueron todos machos con un rango de edad de 8 meses hasta 4 años, en todos los casos cazaban roedores, tenían el plan sanitario incompleto y no habían recibido vacuna contra leptospirosis.

Los resultados de los caninos obtenidos con las técnicas evaluadas fueron colocados en una tabla de contingencia de 2 x 2 entradas, a partir de la cual se calcularon parámetros como sensibilidad, especificidad y valor predictivo de un resultado positivo/negativo de la prueba de TR y la prevalencia aparente de la

enfermedad. La sensibilidad y especificidad de la prueba de TR comparada con la técnica de MAT fue de 75.0% y 65.6% respectivamente. En esta situación de prevalencia, un resultado positivo tiene una probabilidad de 8.6% de ser realmente un individuo enfermo, mientras que un resultado negativo tiene una probabilidad de 98.4% de ser realmente un individuo sano. Además en la población estudiada se ha observado una prevalencia real del 4.1%, aunque la prueba diagnóstica evaluada muestra una prevalencia aparente del 36.1%.

DISCUSION

El método estándar y de referencia para el diagnóstico serológico de leptospirosis tanto en salud humana como veterinaria es el Test de Aglutinación Microscópica (MAT), que utiliza cultivos de *Leptospira* spp. como antígeno diagnóstico. Sin embargo, este procedimiento requiere no sólo de las instalaciones adecuadas de laboratorio para el mantenimiento de las cepas, sino que es un procedimiento laborioso, que consume tiempo de realización y se necesitan muestras del periodo agudo y convaleciente para una correcta interpretación. Existen también otras pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad como la aglutinación con microcápsulas o látex y la prueba de ELISA utilizando como antígeno microorganismos enteros, fracciones purificadas del mismo y también proteínas recombinantes. Asimismo, se ha avanzado en el diagnóstico molecular tanto para el material clínico humano como veterinario. Sin embargo, la serología sigue siendo necesaria para confirmar el diagnóstico de leptospirosis ante una sospecha clínica de la enfermedad y para realizar diagnósticos diferenciales con otras enfermedades.

En nuestro estudio, de las 97 muestras de suero analizadas, el 21% fueron reactivas al método estándar MAT, sin embargo, sólo el 4% fueron casos confirmados según lo establecido en el Manual de eventos de notificación obligatoria de enfermedades en pequeños animales (título a MAT mayor o igual a 1/800, no vacunados contra leptospirosis y con signología clínica y parámetros de laboratorio compatibles con la enfermedad). En los caninos con leptospirosis confirmada, se observaron títulos de anticuerpos que oscilaron entre 800 a 3200. En relación con la frecuencia de los serovares evaluados, nuestros resultados concuerdan con otros estudios realizados en La Plata y Rosario donde los serovares más frecuentes fueron Canicola y Castellonis (Martin et al 2014; Zabala et al 2013). No obstante, difieren de lo hallado por Arias et al 2005 y Rubel et al 1997 donde el serovar más predominante fue Pyrogenes. Estos estudios demuestran que la epidemiología de la leptospirosis no

es estática y que, dependiendo de los factores de riesgo a los que se encuentren expuestos los caninos, su estado de vacunación y la región geográfica en la que habitan, varía la prevalencia de la enfermedad y la presentación de un determinado serovar.

EL bajo porcentaje de casos confirmados en este estudio fue un hallazgo inesperado, debido a que las condiciones ambientales de la zona en la que se realizó el muestreo de los animales eran propicias para la presentación de la enfermedad. Sin embargo, al tratarse de una enfermedad con características clínicas similares a otras afecciones sistémicas es esperable que un porcentaje de los casos sospechosos sean descartados luego de la realización de estudios complementarios pertinentes. Interesantemente, de los caninos confirmados, el 100% fueron machos de entre 8 meses y 4 años de edad, en todos los casos tenían contacto con aguas estancadas y se los había observado cazando roedores; con lo cual podemos ratificar que, como era de esperar, la presencia de estos factores favorece a la aparición de la enfermedad. Asimismo, el 100% de perros eran utilizados como animales de compañía o guardia y por lo tanto en contacto estrecho con personas. Este hecho nos alerta sobre la transmisión de la enfermedad y sobre todo en aquellos casos en los cuales una vacunación de los perros podría evitar la aparición de signología clínica pero el animal eliminaría leptospiras al medio maximizando el riesgo de infección humana.

Existen diferentes criterios en los cuales podemos basarnos para catalogar a un animal positivo a leptospirosis. Algunos autores, consideraban como positivos aquellos que tenían un título mayor a 1/100 o 1/200 (Ambily et al 2014; Libenbaun et al 2002), no vacunados y con signología clínica de la enfermedad. Sin embargo, consideramos que el muestreo pareado con títulos que indiquen seroconversión sería la forma más certera de diagnosticar serológicamente a un animal como positivo a leptospirosis. Esto es muy dificultoso en medicina veterinaria y más aún en la zona de muestreo de este trabajo, debido a que la consulta al veterinario no es habitual, en especial en esos casos en que los pacientes mejoran con el tratamiento inicial. Por lo tanto, en nuestro estudio tomamos como animales positivos (casos confirmados) los lineamientos del Manual de eventos de notificación obligatoria de zoonosis en pequeños animales y avalado por otros trabajos científicos (Galarza et al 2011; Ghneim et al 2007; Goldestein et al 2006). Existen en la literatura reportes muy variados sobre la eficiencia de la prueba de aglutinación rápida en placa (TR) para leptospirosis, que van desde sensibilidades similares con el MAT en suero humano, porcino y bovino, a consecuencia de modificaciones en la preparación de los antígenos hasta la incorporación de diferentes cepas (*L. biflexa*) para optimizar la

concordancia con la prueba de MAT en sueros humanos. Sin embargo, la mayoría de los autores sugieren que, a pesar de una buena concordancia en muestras de suero humano, los resultados en muestras de suero de animales son generalmente menos favorables.

En nuestro estudio, los resultados de la prueba de macroaglutinación TR fueron muy disimiles a los observados con MAT, la prueba de TR arrojó el 36% de animales reactivos o positivos, con presencia de 1 animal falso negativo (Negativos a TR pero considerado caso confirmado) y 35 animales falsos positivos (Positivos a TR pero no considerados casos confirmados). Teniendo en cuenta estos datos, encontramos la prueba de TR como de baja sensibilidad (75%) y muy baja especificidad (65.6%). Estos hallazgos coinciden con algunos autores pero difieren de los observados por otros, tanto en sueros humanos como animales, probablemente debido a las características de fabricación del antígeno TR. Vanasco et al en humanos, demostraron que la prueba de TR presentaba una baja sensibilidad (71%) en los primeros 10 días de la enfermedad que es justamente donde se esperaría que sea elevada para permitir la detección precoz de la mayor cantidad de casos, más aún si este método se emplea como tamiz y sólo se derivan los positivos para su confirmación por MAT. Sin embargo, se contraponen con la elevada sensibilidad de 97.7% e incluso 99% respecto de la MAT hallados previamente en el único estudio previo de evaluación efectuado en Argentina también a partir de sueros humanos (Seijo and Mazonelli 1992).

En caninos, Lilenbaun et al 2002, obtuvo para una prueba de aglutinación macroscópica realizada con serovariedades Canicola y Copenhageni una sensibilidad de 94,3% y especificidad de 91,7%. No obstante, utilizó un criterio de confirmación de casos diferente al nuestro.

De acuerdo a los datos de este trabajo, consideramos que la prueba de TR no debería emplearse como prueba tamiz en perros, debido a su baja sensibilidad a pesar de ser considerada segura, rápida y sencilla, estable y accesible en pequeños laboratorios.

Además de la baja sensibilidad encontrada en este estudio para la prueba de TR, los principales inconvenientes de esta técnica son que la interpretación puede ser dudosa, no es adecuada para estudios epidemiológicos, identificación de cepas, evaluación del probable serogrupo infectante y confirmación de enfermedad para la vigilancia de salud pública. La infección por otros serovares, como Pomona, Bratislava y Grippotyphosa, que han aumentado en algunos países, no se detectan bien en esta

prueba. Por estas razones, la técnica de MAT, particularmente cuando la serología pareada es posible, permanece como el mejor método diagnóstico disponible.

La prevalencia real en la población estudiada fue solo del 4.1% que es considerada muy baja en comparación con otros reportes. Sin embargo, es importante señalar que, para este dato de prevalencia, partimos de casos confirmados con título de 1/800 o superiores (Galarza et al 2011; Ghneim et al 2007; Goldestein et al 2006). Si consideráramos, como por otros autores, valores de 1/100 (Silva 2007) o valores de 1/200 (Lilenbaun et al 2002) para estimar la prevalencia, los valores serían mucho mayores. En nuestro propio estudio si consideráramos un título a MAT de 1/200 o mayor, la prevalencia subiría a 18.1%. Por lo expuesto, como veterinarios epidemiólogos, deberíamos cuestionarnos en nuestros trabajos si ante las sospechas de leptospirosis canina que asisten a nuestros consultorios estamos sobrevalorando la prevalencia de una enfermedad o por lo contrario, la estamos subestimando. Asimismo, deberíamos tener presente que la serología nos brinda una herramienta valiosa para arribar al diagnóstico de esta enfermedad, pero no debe ser la única sino que debería acompañarse con datos adicionales: sintomatología clínica, análisis de laboratorio clínico, diagnóstico diferencial con otras patologías y siempre partiendo una certera anamnesis, para de esta manera arribar a un diagnóstico correcto de leptospirosis.

BIBLIOGRAFIA

Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. Veterinary Microbiology. 2010; 287-296.

Ahmed A, Klaasen H, van der Veen M, van der Linden H, Goris M, Hartskeerl RA. Evaluation of Real-Time PCR and Culturing for the Detection of Leptospire in Canine Samples. Advances in Microbiology. 2012; 2: 162-70.

Ambily R, Mini M, Joseph S, Gontu A. Outer membrane Protein based Latex Agglutination Test for diagnosis of canine leptospirosis in Kerala, India. International Journal of Advanced Research (2014), Volume 2, Issue 7, 684-687.

Arias D., Arauz S., Stornelli A., Stanchi N., Renner E., Martino P., Gatti M. Comparación de cuatro antígenos para la determinación de anticuerpos antileptospiras en serología por ensayo inmuno enzimático (ELISA) en leptospirosis canina. Rev Biomed 1999; 10:167-172.

Arias, D., Arauz, S., Stornelli, A., Ramírez, B., Stanchi, N. Prevalencia serológica a tres cepas de *Leptospiras* en caninos de La Plata, Berisso y Ensenada. *Revista de Enfermedades Infecciosas Emergentes*. 2005; 3 (1): 29-30.

Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico (AAVLD), 1994. Manual de Leptospirosis. Comisión científica permanente sobre leptospirosis.

Birnbaum, N., Barr, SC., Center, SA., Schermerhorn, T., Randolp, JF., Simpson, KW. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: Serological and clinicopathological features. *J Small Anim Pract*. 1998; 39:231–236.

Brihuega, B. Leptospirosis- Técnicas diagnósticas. *Rev. Enfermedades Infecciosas Emergentes (REIE)* 2010; N 5.

Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, Everard CO, Terpstra WJ, Levett PN. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol*. 1995; 43 (2): 110-4.

Dey, S., Mohana, CM., Kumar, TMA., Ramadass, P., Nainar, AM., Nachimuthu, K. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine Leptospirosis. *Veterinary Microbiology* 2004;103: 99–106.

Faine S. Guidelines for the control of Leptospirosis. World Health Organization (WHO). Geneva 1982.

Fontaine, GA. Canine Leptospirosis - Do we have a problem? *Veterinary Microbiology* 2006; 117 19–24.

Fraga, TR., Barbosa, As., Isaac, L. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune evasion From the Complement System. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2011; 73, 408-419.

Galarza CM, Diaz Rojas CA, Dalmau Barros EA. Diagnóstico de leptospirosis canina por medio de las tecnicas Dot-ELISA y MAT en perros con enfermedad renal en Bogota. *Rev. Med. Vet.: N.º 21*. 2011. 133-145.

Geisen, V., Stengel, C., Brem, S., Muller, W., Greene, C., Hartmann, K. Canine leptospirosis infections – clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases) *Journal of Small Animal Practice*. 2007; 48, 324-328.

Ghneim GS, Viers JH, Chomel BB, Kass PH, Descollonges DA, Johnson ML. Use of a case-control study and geographic information systems to determine environmental and demographic risk factors for canine leptospirosis. *Vet Res.* 2007;38(1):37-50.

Goldstein, RE., Lin, RC., Langston, CE., Scrivani, PV., Erb, HN., Barr, SC. Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. *J Vet Intern Med.* 2006; 20:489–494.

Greene, C., J. Sykes, C. Brown y K. Hartmann. *Enfermedades infecciosas del perro y el gato.* 3ra Edición, Vol.1, Ed. Inter-Médica., Buenos Aires, Argentina. 2008.

Klaasen H.L.B.M., van der Veen M., Molkenboer M.J.C.H., Bruderer U. Development of *Leptospira* in vitro potency assays: EU/industry experience and perspectives. *Biologicals* (2013) 1-8.

Kohn, B., Steinicke, K., Arndt, G., Gruber, AD., Guerra, B., Jansen, A., Kaserhotz, B., Klopffleisch, R., Lotz, F., Luge, E., Nöckler, K. Pulmonary abnormalities in dogs with leptospirosis. *J Vet Intern Med.* 2010; 24:1277– 1282.

Levett P.N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis?. *Clin. and App. Immunology Rew.* 2004; 4: 435-448.

Levett, P.N., Branch, SL., Whittington, CU., Edwards, CN., Paxton, H. Two Methods for Rapid Serological Diagnosis of Acute Leptospirosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 2001, p. 349–351 Vol. 8, No. 2.

Lilenbaum W, Ristow P, Fráguas SA, da Silva ED. Evaluation of a rapid slide agglutination test for the diagnosis of acute canine leptospirosis. *Rev Latinoam Microbiol.* 2002; 44(3-4):124-8.

Linzitto O; Stanchi N; Brihuega B; Passaro D; Soncini A; Gatti M; Tunes M; Del Curto B; Martin PL; Orellana J. *Leptospiras y leptospirosis en Argentina.* La Plata: Edición el autor. 2014. pag.57. ISBN 978-987-33-5783-1.

Martin PL, Molina MCa; Stanchi N; Corrada Y; Cuelli A; Arauz MS; Cobos M; Ozaeta MB; De Palma V. Prevalencia de leptospirosis en caninos de La Plata. Argentina. San Miguel de Tucumán. 2014. Libro. Resumen. XX Reunión científico-Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. Asociación Argentina de Veterinarios de Diagnóstico de Laboratorio.

Martin PL, Arauz MS, Linzitto O, Stanchi N. Diagnóstico de Leptospirosis canina. Suplemento Técnico Veterinario de la Revista del Colegio de Veterinarios. 2015 -11-10.

Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Girons Saint I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. J Clin Microbiol. 1992; 30 (9): 2219-24.

Miller, RI., Ross, SP., Sullivan, ND., Perkins, NR. Clinical and epidemiological features of canine leptospirosis in North Queensland. Journal Veterinary Australian. 2007; 85, Nos 1 & 2. 13-19.

Minke, JM., Bey, R., Tronel, JP., Latour, S., Colombet, G., Yvorel, J., Cariou, C., Guiot, AL., Cozette, V., Guigal, PM. Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent inactivated leptospirosis vaccine. Veterinary Microbiology 2009; 137: 137–145

Monte LG, Jorge S, Luiz JP, Sinnott F, Seixas KS, Aleixo JA, Samartino LE, Conceição FR, Hartleben CP. Diagnosis of canine leptospirosis using an immunomagnetic separation-PCR method. Braz J Microbiol. 2012 Apr; 43(2):602-5.

Nelson, R., Couto, G. Medicina interna de pequeños animales. 3ra Edición, Vol 2, Ed.. Inter- Médica. Buenos Aires, República Argentina. 2005.

Normativa de Notificación de Enfermedades de Denuncia Obligatoria en Veterinaria en pequeños animales, 2016

Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis AN, Durski K, Hartskeerl RA. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014; 78 (1):1-8.

Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. Médecine et maladies infectieuses 43 (2013) 1–9.

Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, Nally JE. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010 Oct; 29(10):1305-9.

Rossetti, CA., Liem, M., Samartino, LE., Hartskeerl, RA. Buenos Aires, a new *Leptospira* serovar of serogroup Djasiman, isolated from an aborted dog fetus in Argentina. Veterinary Microbiology 2005; 107: 241-248.

Rubel, D., Seijo, A., Cernigoi, B., Viale, A., Wisnivesky-Colli, C. *Leptospira interrogans* en una población del Gran Buenos Aires: variables asociadas con la seropositividad. Rev. Panam. Salud Pública/Pan Am. J. public Health 1997; 2 (2)102-105.

Sehgal S. C., Vijayachari P., Sharma S. Sugunan A. P. LEPTO Dipstick: a rapid and simple method for serodiagnosis of acute leptospirosis Transactions of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene (1999) 93,161-164.

Seijo AC, Mazzone J. Evaluación del antígeno termorresistente en el diagnóstico de la leptospirosis humana. Acta Bioq Clínica Lat 1993;27(4):487-491.

Silva RF, Riedemann S. Seroprevalencia de leptospirosis canina en perros atendidos en clínicas veterinarias, mediante aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta. Arch. Med. Vet. 39, N° 3, 2007, págs: 269-274.

Stanchi N., Martino P., Gentilini E., Leardini N., Reinoso E.H., Echeverría G, Copes J. Microbiología Veterinaria. Editorial Ed. Inter-Médica. Argentina 2007. ISBN 978-950-555-321-1.

Sykes, JE., Hartmann, K., Lunn, KF., Moore, GE., Stoddard, RA., Goldstein, RE. ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment and Prevention. J. Vet. Intern. Med. 2011; 25:1-13.

Tealdo, MS., Romero, GN., Autrey, CD., Samartino, L. Serología positiva a *Leptospira interrogans*, serovar *cynopteri* en caninos de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. In Vet. 2007; 9 (1): 59-65 ISSN 1514-6634.

Townsend, WM., Stiles, J., Krohne, SG. Leptospirosis and panuveitis in a dog. Veterinary Ophthalmology. 2006; 9, 3, 169–173.

Vanasco NB, Schmeling MF, Chiani Y, Lottersberger J, Tarabla HD. Diagnóstico de leptospirosis humana: evaluación de la aglutinación macroscópica en diferentes etapas de la enfermedad. Salud Publica Mex 2012; 54:530-536.

Xu C, Loftis A, Ahluwalia SK, Gao D, Verma A, Wang C, Kaltenboeck B. Diagnosis of Canine Leptospirosis by a Highly Sensitive FRET-PCR Targeting the lig Genes. PLoS One. 2014 Feb 24; 9(2):e89507.

Yang, C., Wu, M., Pan, M., Hsieh, W., Vandewalle, A., Huang, C. The Leptospira Outer Membrane Protein LipL32 Induces Tubulointerstitial Nephritis-Mediated Gene Expression in Mouse Proximal Tubule Cells. J Am Soc Nephrol 2002; 13: 2037–2045.

Zabala, AS., Anthony Omezzolli, LM., Poli Lovagnini, G., Francois Barbagelata, S. Seropositividad a Leptospira interrogans en perros de la ciudad de Rosario, Argentina. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2013; 65(2): 185-190.